



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

0 095 426
A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 83401052.2

(22) Date de dépôt: 28.05.83

(51) Int. Cl.³: A 61 K 39/106
C 07 C 103/52

(30) Priorité: 26.05.82 FR 8209167

(43) Date de publication de la demande:
30.11.83 Bulletin 83/48

(84) Etats contractants désignés:
BE CH DE FR GB IT LU

(71) Demandeur: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
13 Quai Anatole France
F-75700 Paris(FR)

(71) Demandeur: INSTITUT PASTEUR
25-28, rue du Docteur Roux
F-75724 Paris Cedex 15(FR)

(72) Inventeur: Milhaud, Gérard
5, Rue des Saints Pères
F-75006 Paris(FR)

(72) Inventeur: Raulais, Daniel
83, Boulevard Saint Michel
F-75005 Paris(FR)

(72) Inventeur: Rivaille, Pierre
28, Rue du Petit Musc
F-75004 Paris(FR)

(72) Inventeur: Le Thuillier née Tchernov, Georgette
12, Rue Jean Moulin
F-91420 Moranois (I.P.)(FR)

(72) Inventeur: Siffert, Odile
17, Rue des Missionnaires
F-78000 Versailles (I.P.)(FR)

(72) Inventeur: Dodin, André
Courances
F-91490 Milly La Foret (I.P.)(FR)

(72) Inventeur: Guyon-Gruaz, Anne
41, Avenue Victor Hugo
F-92100 Boulogne (CNRS)(FR)

(72) Inventeur: Delmas, Agnès
49, Rue Danton
F-94270 Le Kremlin Bicêtre (CNRS)(FR)

(74) Mandataire: Combe, André et al,
CABINET BEAU DE LOMENIE 55 rue d'Amsterdam
F-75008 Paris(FR)

(54) Polypeptides de synthèse contenant au moins une séquence de la sous-unité B1 de la toxine cholérique et médicaments les contenant.

(57) La présente invention concerne de nouveaux médicaments caractérisés en ce qu'ils comportent au moins une séquence de la sous unité B₁ de la toxine cholérique, ladite séquence comportant au moins une arginine en 35, 67 ou 73 de ladite sous unité.

Elle concerne également les polypeptides de synthèse constitué par ladite séquence.

EP 0 095 426 A1

Polypeptides de synthèse contenant au moins une séquence de la sous-unité B₁ de la toxine cholérique et médicaments les contenant.

La présente invention concerne un médicament contenant au moins une séquence de la sous unité B₁ de la toxine cholérique. Elle concerne également les polypeptides de synthèse constitués par une telle séquence.

On sait que la toxine cholérique est constituée de deux sous unités A et B, B étant elle-même constituée de 5 sous unités dites B_1 . Chaque sous unité B_1 contient 103 acides aminés dont l'enchaînement est le suivant :

Thr-Pro-Gln-Asn-Ile-Thr-Asp-Leu-Cys-Ala-Glu-Tyr-His-Asn-
 10
 20
 Thr-Gln-Ile-His-Thr-Leu-Asn-Asn-Lys-Ile-Phe-Ser-Tyr-Thr-
 30
 40
 50
 Glu-Ser-Leu-Ala-Gly-Lys-Arg-Glu-Met-Ala-Ile-Ile-Thr-
 60
 Phe-Lys-Asn-Gly-Ala-Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Val-Pro-Gly-
 70
 80
 Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala-Ile-Glu-Arg-
 90
 Met-Lys-Asn-Thr-Leu-Arg-Ile-Ala-Tyr-Leu-Thr-Glu-Ala-
 100
 Lys-Val-Glu-Lys-Leu-Cys-Val-Trp-Asn-Asn-Lys-Thr-Pro-
 110
 His-Ala-Ile-Ala-Ala-Ile-Ser-Met-Ala-Asn.

Pour plus de détails sur la structure de ces sous unités B₁, on pourra se référer à l'article de Chun-Yen LAI, intitulé : "Determination of the Primary Structure of Cholera Toxin B Subunit" dans "The Journal of Biological Chemistry" 252, 20, 7249-7256, 1977.

On sait également que, lors de l'action de la toxine cholérique, ladite sous-unité B joue le rôle de fragment de fixation de la toxine sur les membranes des cellules et que l'unité A agit sur cette cellule pour y exercer une action nociive.

A cet effet, on peut citer notamment :

- le brevet français 78 18 706 publié sous le numéro
2 395 030.

- l'article de Jan HOLMGREN, intitulé "Actions of Chole-
ra toxin and the prevention an treatment of cholera" dans "Nature"
35 Vol. 292, 30 juillet 1981 p. 413-417,

- l'article de Jan HOLMGREN et al. intitulé "Development of improved cholera vaccine based on subunit toxoid" dans "Nature" Vol. 269, 13 octobre 1977 p. 602-604.

On a déjà tenté de fractionner la toxine cholérique en ses deux sous unités mais cette opération est délicate et coûteuse. Cependant, elle a permis de mettre en évidence le fait que, dans le mécanisme de fixation de la toxine sur les parois des cellules, les Arginines en 35, 67 et 73 de la sous unité B₁ semblaient jouer, du fait de leur existence et de leur environnement, un rôle très important (L.K. DUFFY et S.Y. LAI - Biochem. Biophys. Res. Com. 91 numéro 3 1005 (1979)).

Il a été trouvé, et c'est là l'objet de la présente invention, que les médicaments contenant, comme principe actif, un polypeptide constitué par au moins une séquence de la sous unité B₁ de la toxine cholérique contenant au moins une Arginine en 35, 67 ou 73 avaient une efficacité certaine contre l'infection de l'organisme par tout microorganisme sensible, en particulier *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*. Selon l'invention on appelle "séquence de la sous unité B₁ de la toxine cholérique" une suite d'acides aminés reproduisant la suite des acides aminés rencontrés dans ladite toxine cholérique. Compte tenu du rôle spécifique que l'on est amené à attribuer à l'Arginine en 35, 67 ou 73 de ladite suite, ladite séquence doit reproduire aussi exactement que possible la configuration dans la suite des acides aminés que l'on rencontre, dans la sous unité B₁ de la toxine cholérique, au voisinage immédiat de ces Arginines. On peut admettre que, pour les acides aminés situés assez loin, dans la chaîne, desdites arginines, certaines modifications, par exemple remplacement d'un acide aminé par un acide aminé considéré comme équivalent ou modification (par exemple estérification) des fonctions latérales des acides aminés, sont convenables.

Il convient, selon l'invention, que la séquence utilisée soit suffisamment longue pour qu'elle reproduise les propriétés de fixation de la sous unité B₁ mais cependant qu'elle soit suffisamment courte pour pouvoir être synthétisée dans des conditions acceptables. Ainsi, si l'on peut utiliser un polypeptide dont la séquence d'acides aminés correspond à la séquence 20-75 de la sous unité B₁, il peut être

préférable d'utiliser un polypeptide de séquence 30-50 ou de séquence 50-75 de cette sous unité. On peut également employer simultanément, dans le même médicament, ces deux séquences. De plus, il importe que le polypeptide selon l'invention soit suffisamment hydrophile pour être un bon immunogène.

Les séquences préférées utilisables selon l'invention sont donc les suivantes :

- séquence 30-50 :

H₂N-Ser-Leu-Ala-Gly-Lys-Arg-Glu-Met-Ala-Ile-Ile-Thr-
30 35 40
Phe-Lys-Asn-Gly-Ala-Thr-Phe-Glu-Val-COOH
45 50

- séquence 50-75 :

H₂N-Val-Glu- Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-
50 55 60
Lys-Lys-Ala-Ile-Glu-Arg-Met-Lys-Asn-Thr-Leu-Arg-Ile-
65 70
Ala-COOH.
75

et la séquence 30-75.

Dans les polypeptides de l'invention, les acides aminés ont de préférence tous la configuration L.

Les polypeptides de l'invention sont obtenus par synthèse en phase solide avec utilisation des agents protecteurs et des agents de couplage couramment mis en oeuvre dans la synthèse peptidique. La purification des polypeptides selon l'invention peut être réalisée par filtration sur gel et résine échangeuse d'ions. Un exemple de purification est donné dans les exemples illustratifs ci-après.

On a pu montrer que le rôle de ces principes actifs étaient d'une part, en se fixant sur certaines cellules, de pouvoir entrer en compétition avec les autres molécules nocives qui présentent un mode de fixation voisin et d'éviter ladite fixation de ces molécules nocives et, d'autre part, de provoquer la sécrétion de certains anticorps bloquants. Le médicament selon l'invention sera donc actif vis-à-vis de tout microorganisme dont l'action peut être combattue par l'un ou l'autre de ces mécanismes. Il a été trouvé notamment que, de façon tout à fait naturelle, le médicament selon l'invention était utilisable comme médicament curatif ou, de préférence, comme vaccin.

pour la protection contre le choléra et contre les infections animales ou humaines provenant de l'action d'Escherischia Coli (entérotoxine LT).

Le médicament peut être utilisé par voie orale, intrapéritonéale, sous cutanée ou intraveineuse. Dans le cas d'un vaccin, le nombre total des acides aminés de la séquence sera de préférence de l'ordre de 15 à 30 unités lorsque le peptide est injecté sans porteur naturel ou synthétique d'immunisation.

Les séquences selon l'invention ne sont pas toxiques aux doses normales puisque des souris ont pu recevoir sans présenter des signes graves des doses d'environ 100 microgrammes de produit actif par animal et que des lapins ont pu recevoir avec les mêmes résultats 1 milligramme, par animal, de principe actif.

Les essais pharmacologiques laissent à penser que les médicaments selon l'invention devraient contenir, par prise unitaire, de 50 à 500 mg de principe actif pour un médicament et de 1 à 10 mg de principe actif pour un vaccin.

Les exemples non limitatifs suivants illustrent l'invention :

Exemple 1

Principe de synthèse des séquences selon l'invention :

On ne donne que les principes généraux de la synthèse utilisée puisqu'il s'agit d'une application de méthode connue de synthèse des peptides.

1° support solide

Pour obtenir les polypeptides sous forme de carboxy-terminal libre, on a utilisé, comme support, le chlorométhyl-polystyrène réticulé à 1 % avec du divinyl-benzène.

2° Protection des fonctions des acides aminés

La fonction α aminée est protégée par le tertiobutyloxy-carbonyle ; les fonctions latérales sont protégées par les groupes suivants : Nitro pour le guanidyle de l'Arginine, Ester benzylique pour les β et γ carboxyles des acides aspartique et glutamique, 2-chlorocarbo-benzoxy pour l' ϵ -amine de la Lysine, benzyl-éther pour les hydroxyles de la Sérine et de la Thréonine, le tosyle pour l'imidazole de l'histidine.

3° Agent de couplage

Chacun des acides aminés est couplé avec un mélange équimoléculaire de dicyclohexylcarbodiimide et de 1-hydroxybenzotriazole, en utilisant comme solvant de couplage le mélange chlorure de méthylène/diméthylformamide (1:1 en volume). La totalité du couplage 5 est contrôlée par un test à la ninhydrine.

Après chaque couplage, on élimine l'agent protecteur de la fonction aminée par traitement à l'aide du mélange acide trifluoroacétique/chlorure de méthylène (30:100 en volume - 30 mn) puis neutralisation à l'aide de diisopropyléthylamine dans du chlorure de méthylène (10:90 en volume - 10 mn). Après addition de méthionine, on ajoute au mélange acide trifluoroacétique/ CH_2Cl_2 1 % du mélange réducteur éthane : dithiol (1:2).

4° Coupure du peptide

A la fin de la synthèse le peptide est coupé du polymère par action de l'acide fluorhydrique liquide.

5° Purification

Les peptides sont purifiés par filtration sur gel. La purification est affinée par chromatographie échangeuse d'ions à l'aide 20 d'un gradient de conductivité.

6° Contrôle de pureté

Elle est effectuée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide et par électrophorèse en milieu sodium dodécylsulfate sur gel de polyacrylamide.

La purification des polypeptides 30-50 et 50-75 a été réalisée selon le mode opératoire ci-après :

A - filtration sur gel

On a utilisé comme gel, le produit connu sous la dénomination commerciale "BIOGEL P 4" et comme éluant l'acide acétique 1 M. 30 La détection a été effectuée aux UV (à 254 et 280 nm) et par radioactivité, auquel cas on fixe sur le N-terminal du polypeptide synthétisé de la ^{14}C Alanine.

Les caractéristiques de filtration utilisées pour les deux séquences sont celles indiquées ci-après :

Polypeptide de séquence 30-50

- colonne de 100 cm de hauteur, 5 cm de diamètre,
- température 20°C
- volume de chaque fonction recueillie : 10 ml
- vitesse d'élution : 4 fractions à l'heure.

5

On a recueilli le volume d'élution entre 650-800 ml.

Polypeptide de séquence 50-75

- colonne de 100 cm de hauteur, 2,5 cm de diamètre
- température 4°C
- volume de chaque fraction recueillie : 6 ml
- vitesse d'élution : 4 fractions à l'heure.

10

On a recueilli le volume d'élution entre 180-300 ml.

B - Chromatographie sur résine échangeuse d'ions

Les peptides recueillis après lyophilisation des volumes d'élution ont ensuite été chromatographiés sur une colonne de carboxyméthylcellulose CM 32 (diamètre : 2 cm, hauteur : 4 cm) avec comme éluant (gradient linéaire) :

20 20 la vitesse d'élution étant de 4 fractions de 5ml par heure.

Le polypeptide 30-50 a élué à 7 mS et le polypeptide 50-75 a élué à 6 mS.

C - Filtration sur gel

25 On a ensuite effectué une filtration sur BIOGEL P₂ des produits recueillis après chromatographie (colonne de 100 cm de hauteur et 1 cm de diamètre).

L'élation a été effectuée avec de l'acide acétique 1 M (vitesse d'élution : 10,5 ml/h). On a recueilli les fractions entre 87-133 ml.

30

L'homogénéité des produits ainsi purifiés a été contrôlée par chromatographie en couche mince (SiO_2 - éluant : butanol/eau/acide acétique 4 : 1 : 1)

Le polypeptide 50-75 a donné un R_f de 0,22 et le poly-polypeptide 30-50, un R_f de 0,31.

Par ailleurs, les polypeptides ainsi obtenus ont donné une seule bande sur gel de polyacrylamide à 15 % de réticulation (pH 4,3 et pH 8,9).

En chromatographie liquide haute performance (remplissage : γ Bondapack C 18), les polypeptides 30-50 et 50-75 ont donné les temps de rétention suivants :

Polypeptide 30-50 : temps de rétention 29 mm avec le système de solvant ci-après :

- A. acide heptafluorobutyrique : eau 0,13 : 99,87 v/v
B. acide heptafluorobutyrique : n-propanol, 0,13 :
99,87 v/v

gradient B:20 % à 45 % en une heure.

Polypeptide 50-75 : temps de rétention 16 mm avec le système de solvants ci-après :

- A. acétate de NH_4 0,05 M/ CH_3CN (95 : 5 v/v)
B. acétate de NH_4 0,05 M/ CH_3CN (5 : 95 v/v)

gradient B : 20 % à 80 % en 30 minutes.

L'analyse des acides aminés des polypeptides 30-50 et 50-75, effectuée par hydrolyse acide en 48 heures à 110°C, à l'aide d'acide chlorydrique 6 N + mercapto-éthanol 0,2 %, a donné les résultats ci-après :

Polypeptide 30-50

Acide aminé (calculé) trouvé :

Ala(3),3,09.Arg(1),0,97,Asp(1),1,39,Glu(2),2,43.
Gly (2),2,04,Ile(2),1,78,Leu(1),1,Lys(2),1,86.
Met(1),0,79,Phe(2),2,Ser(1),1,Thr(2),1,99,Val(1),1,12

Polypeptide 50-75

Ala(3),3,09.Arg(2),2,12,Asp(2),2,33,Glu(4),4,17
Gly(1),1,08,His(1),0,82,Ile(3),3,28,Leu(1),1,06,
Lys(3),3,11,Met(1),0,85,Ser(2),1,67,Thr(1),1,03.
Val(1),1,81.

De la même manière, on a synthétisé le polypeptide constitué par la séquence 30-75 de la sous unité B₁ de la toxine cholérique.

5 Les acides aminés des polypeptides 30-50, 50-75 et 30-75 qui ont été synthétisés comme indiqué ci-dessus avaient tous la configuration L.

Exemple 2

Pour tester les produits synthétisés (séquences 30-50 et 50-75), on a réalisé les essais suivants :

10 1° Fixation sur les érythrocytes d'homme et de rat

La liaison des fragments 30-50, 50-75 et de trois peptides témoins radioactifs a été testée sur les globules rouges. La mesure de la radioactivité libre dans le surnageant ou fixée sur les globules rouges a révélé que le fragment 30-50 se fixe de façon significative et davantage que le fragment 50-75.

15 2° compétition de fixation avec la toxine totale sur les souches Y, (cellules de tumeur surrénales de souris)

Le fragment 30-50 utilisé à raison de 10⁻⁶ moles inhibe totalement la production de corticoïdes induites par l'action de la toxine cholérique (10⁻⁹ molaire) sur ces cellules.

20 3° Propriétés antigéniques

La séquence 50-75 injectée par voie sous-cutanée à des lapins sans adjuvant ni porteur a entraîné rapidement la production d'anticorps qui procurent au sérum un pouvoir vibriolytique jusqu'à une dilution de 1/360. Cette même séquence injectée 3 fois à 4 jours de distance par voie intrapéritonéale ou buccale à des souris a induit des anticorps reconnaissant la toxine cholérique jusqu'à une dilution supérieure au 1/2000 (test ELISA). Le pouvoir vibriolytique des sérum des souris persiste jusqu'au 1/3000 chez les animaux immunisés par voie buccale et jusqu'au 1/6000 chez ceux immunisés par voie intrapéritonéale.

25 Tous les animaux immunisés possèdent une bonne protection contre l'action du vibrion cholérique toxinogène et contre la toxine cholérique dans l'épreuve de l'anse ligaturée décrite ci-après :

30 - des souris "C₅₇ black" ont été immunisées per os avec de la toxine cholérique (5 µg) ou du polypeptide 50-75 (5 µg) aux jours J, J + 10, J + 16, J + 22 et J + 28. Chaque souris a été opérée

sous légère anesthésie à l'éther ; environ 10 cm de l'iléon ont été ligaturés à 5 cm du pylore et 1 μ g de toxine cholérique dans 100 μ l de tampon a été injecté (tampon : 0,05 M tris HCl, 0,2 M NaCl, 0,003 M Na N₃, 0,001 M Na₂ EDTA pH 7,5).

5 Quatre heures après cette injection les animaux ont été sacrifiés, l'anse a été disséquée et mesurée (L en cm) et pesée (P en g) Les résultats obtenus sont :

10	TOXINE CHOLERIQUE			POLYPEPTIDE 50-75		
	LONGUEUR cm	POIDS g	POIDS/LONGUEUR	LONGUEUR cm	POIDS g	POIDS/LONGUEUR
15	9	1,72	0,191	10	0,795	0,079
	9,5	2,23	0,234	9,5	1,505	0,158
	9	1,895	0,210	8	0,4	0,05
	9,5	1,76	0,185	8	0,915	0,114
	10	2,134	0,213	7	0,350	0,05
	20	10,5	2,09			

On a trouvé par ailleurs, que les anticorps anti-toxine cholérique ne reconnaissent pas les fragments 30-50 et 50-75, mais 25 que les anticorps anti-polypeptide 30-50 ou 50-75 reconnaissent les séquences qui les ont engendrés, la toxine, les sous unités B et A et l'entérotoxine LT d'Escherichia Coli.

Les résultats ci-dessus ont été mis en évidence par détermination du taux de dilution de sérum reconnaissant encore l'antigène 30 adsorbé sur une plaque ELISA (ledit antigène étant la toxine cholérique, LT Escherichia Coli, la sous unité A et la sous unité B de la toxine cholérique). Dans ces essais, chaque puits des plaques ELISA et le dosage a été revêtu de 0,25 ug de l'un des antigènes ci-dessus et le dosage a été effectué avec des anticorps de chèvre marqués à la 35 peroxydase, lesdits anticorps de chèvre étant dirigés contre les anticorps totaux de souris.

Les sérums à tester ont été obtenus par immunisation de souris per os ou par voie intrapéritonéale selon le protocole ci-après avec le polypeptide 30-50 ou 50-75 :

5 - immunisation per os : une immunisation ($2\mu\text{g}$ ou $5\mu\text{g}$ de polypeptide dans $100\mu\text{l}$ du tampon constitué par le mélange 1 : 1 (en volume) de :

- A. bicarbonate de sodium (100 g/L) et de
- B. NaCl (8,18 g/L), $\text{PO}_4 \text{H Na}_2 \text{12 H}_2\text{O}$ / (16,71 g/L)
 $\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$ (1,19 g/L)

10 saignée 8 jours après.

- immunisation intrapéritonéale : 2 ou $5\mu\text{g}$ de polypeptide dans du sérum physiologique; deux immunisations à 15 jours d'intervalle et rappel un mois après; saignée huit jours après le rappel.

15 Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-après :

SERUM DE SOURIS IMMUNISEES AVEC	ANTIGENE ($0,25\mu\text{g}$ par puits de plaque ELISA)			
	Sous unité A	Sous unité B	Toxine cholérique	LT ESCHERICHIA COLI
30-50 per os	1/2 000	≈ 0	1/600	1/800
30-50 i.p.	1/500	1/80	1/400	1/300
50-75 per os	1/1 500	1/120	1/900	1/600
50-75 i.p.	1/1 200	1/160	1/300	1/300

R E V E N D I C A T I O N S

1. Médicaments caractérisés en ce qu'ils comportent au moins une séquence de la sous unité B₁ de la toxine cholérique, ladite séquence comportant au moins une arginine en 35, 67 ou 73 de ladite sous unité.
- 5 2. Médicaments selon la revendication 1, caractérisés en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences 30-50 et 50-75 de ladite sous unité.
3. Médicaments selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisés en ce qu'ils contiennent de 50 à 500 mg de ladite séquence.
- 10 4. Médicament selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est un vaccin.
5. A titre de nouveau produit, le polypeptide constitué par au moins une séquence de la sous unité B₁ de la toxine cholérique, ladite séquence comportant au moins une arginine en 35, 67 ou 73 de ladite sous unité.
- 15 6. Polypeptide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence 30-50 : H₂N-Ser-Leu-Ala-Gly-Lys-30
Arg-Glu-Met-Ala-Ile-Ile-Thr-Phe-Lys-Asn-Gly-Ala-Thr-Phe-Glu-Val-COOH
35 40 45 50
20 7. Polypeptide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence 50-75 : H₂N-Val-Glu-Val-Pro-Gly-50
Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala-Ile-Glu-Arg-Met-Lys-Asn-Thr-55 60 65 70
25 Leu-Arg-Ile-Ala-COOH
75
8. Polypeptide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence 30-75.



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 3)
Y,D	NATURE, vol. 269, no. 5629, 13 octobre 1977, pages 602-604 J. HOLMGREN et al.: "Development of improved cholera vaccine based on subunit toxoid" * En entier *	1-8	A 61 K 39/106 C 07 C 103/52
Y,D	--- NATURE, vol. 292, no. 5822, 30 juillet 1981, pages 413-417, MacMillan Journals Ltd., Chesham, Bucks., GB. J. HOLMGREN: "Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera" * En entier *	1-8	
Y,D	--- GB-A-1 058 828 (BEHRINGWERKE AG.) * En entier *	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 3)
Y,D	--- FR-A-2 395 030 (SANDOZ S.A.) * En entier *	1-8	A 61 K C 07 C
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE	Date d'achèvement de la recherche 09-08-1983	Examinateur REMPP G.L.E.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date		
A : arrrière-plan technologique	D : cité dans la demande		
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons		
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant		

THIS PAGE BLANK (USPTO)